

USE  
OF  
HPPD INHIBITORS  
AS  
SELECTION AGENTS  
IN PLANT TRANSFORMATION

Frederic Garcon  
-and-  
Bernard Pelissier

PATENT APPLICATION  
(In French)  
-with-  
LIST OF SEQUENCES  
-and-

Two (2) Sheets of Drawings

PM00053 . . . . (5500\*101)

"Express Mail" mailing label  
number EK219526068

Date of Deposit  
-August 02, 2001-

I hereby certify that this paper or fee is  
being deposited with the United States Postal  
Service "Express Mail" Post Office to  
Addressee" service under 37CFR 1.10 on the  
date indicated above and is addressed to Box  
PATENT APPLN., Comm. of Patents,  
Washington, D.C. 20231

-Barbara J. Miller-

(Typed or printed name of person mailing  
paper or fee)

(Signature of person mailing paper or fee)

## Utilisation d'inhibiteurs d'HPPD comme agents de sélection dans la transformation de plantes

La présente invention concerne l'utilisation d'inhibiteurs d'HPPD comme agents de  
5 sélection dans la transformation de cellules végétales et de plantes par génie génétique. La  
transformation de cellules végétales et de plantes par génie génétique consiste  
généralement à introduire un gène étranger, ou hétérologue codant pour une protéine  
d'intérêt, dans le génome des cellules végétales et des plantes qui les contiennent. Ce gène  
hétérologue une fois intégré dans le génome des cellules végétales est alors exprimé pour  
10 conférer aux dites cellules et aux plantes qui les contiennent un nouveau caractère lié à la  
fonction du gène hétérologue qui sera exprimé.

De nombreuses techniques de transformation des cellules végétales et de plantes par  
génie génétique ont été développées et abondamment décrites dans la littérature. On pourra  
distinguer d'une part les méthodes cherchant à introduire un fragment d'ADN porteur du  
15 gène hétérologue sous forme dite d'ADN nu. Il s'agit notamment de bombarder des  
cellules, des protoplastes ou des tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les  
séquences d'ADN. D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou  
l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG. On distinguera  
d'autre part les méthodes consistant à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un  
20 gène chimère hétérologue dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri  
d'*Agrobacterium rhizogenes*. L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en  
fonction de la nature de la cellule végétale ou de la plante à transformer. On citera  
notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US  
5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US  
25 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US  
5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US  
5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539  
563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

Les méthodes de transformation de cellules végétales comprennent généralement les  
30 étapes suivantes:

- a) préparation de cellules végétales compétentes aptes à recevoir le gène  
hétérologue dans un milieu approprié,
- b) transformation des cellules compétentes avec le gène hétérologue

c) croissance et sélection des cellules transformées comprenant le gène hétérologue dans un milieu approprié.

Les cellules végétales compétentes peuvent être des cals embryogéniques, des cultures cellulaires sur support solide ou en suspension, ou des tissus embryogéniques, bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

L'obtention de plantes transgéniques, comprenant le gène hétérologue intégré dans son génome, consiste ensuite à effectuer les étapes suivantes de :

d) régénération de plantes à partir des cellules transformées dans un ou plusieurs milieux appropriés, et le cas échéant,

e) obtention et récupération des graines des plantes transformées fertiles.

La pollinisation des plantes régénérées pour l'obtention des graines des plantes transformées fertiles s'effectue soit par auto-pollinisation, soit par pollinisation croisée avec une variété non transformée de la même plante, ou éventuellement avec une autre variété ayant intégré de manière stable dans son génome un autre gène hétérologue.

Les graines des plantes transformées sont employée ensuite dans des programmes de sélection classique pour l'obtention de nouvelles variétés de plantes transgéniques ayant intégré le gène hétérologue de manière stable dans leur génome. De tels programmes de sélection sont bien connus de l'homme du métier et comprennent l'évaluation des propriétés agronomiques des plantes obtenues et de leur descendance, en particulier vis à vis des propriétés agronomiques liées à l'expression du gène hétérologue.

La sélection des cellules transformées est effectuée au moyen d'un gène marqueur de sélection. De tels gènes marqueurs et leur utilisation pour la transformation d'organismes hôtes sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Parmi les gènes codant pour des marqueurs de sélection, on peut d'une part les gènes codant pour des enzymes facilement identifiables comme l'enzyme GUS (ou GFP, " Green Fluorescent Protein "), des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. On citera d'autre part les gènes de résistance aux antibiotiques et les gènes de tolérance aux herbicides (bialaphos, glyphosate ou isoxazoles). Dans ce cas, la sélection s'effectue en introduisant dans le milieu approprié pour la croissance et la sélection des cellules transformées un agent de sélection de type antibiotique ou herbicide qui est létal pour les cellules non transformées, seules les cellules comprenant le gène de résistance aux antibiotiques ou aux herbicides étant capables de croître sur le milieu de sélection. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment

décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567, WO 97/04103 ou WO 99/24585.

Les gènes marqueur de sélection sont introduits dans les cellules hôtes de manière simultanée avec le gène hétérologue, soit dans un même vecteur, les deux gènes étant  
5 associés de manière convergente, divergente ou colinéaire (WO 95/06128, US 5 731 179), ou encore dans deux vecteurs employés simultanément pour la transformation des cellules végétales. Dans certaines conditions (US 5 731 179) et notamment dans le cas où le gène hétérologue et le gène marqueur de sélection sont introduit séparément dans deux vecteurs de manière simultanée, le gène hétérologue codant pour une protéine d'intérêt et le gène  
10 marqueur de sélection peuvent s'intégrer sur deux chromosomes différents dans le génome de la plante transformée. Il est possible, après récupération de plantes transformées fertiles d'éliminer le gène marqueur pour n'obtenir des plantes transformées ne comprenant que le gène hétérologue codant pour une protéine d'intérêt. Cette élimination se fait par autofécondation ou croisement des plantes transformées comprenant le gène hétérologue  
15 et le gène marqueur de sélection avec une variété non transformée de la même plante, la ségrégation des deux gènes s'effectuant de manière Mendélienne classique.

Lorsque le gène hétérologue codant pour une protéine d'intérêt est un gène de tolérance herbicide, on peut employer le seul gène hétérologue comme marqueur de sélection dans le procédé de transformation des cellules végétales ou des plantes.

20 L'utilisation de gènes de tolérance aux herbicides inhibiteurs d'HPPD comme marqueurs de sélection dans les procédés de transformation des cellules végétales et des plantes a été décrite dans la littérature (WO 96/38567, WO 99/24585). L'inhibiteur d'HPPD est introduit dans le milieu de culture des cellules après transformation (étape c), à l'instar des autres agents de sélections selon les pratiques habituelles de l'homme du  
25 métier. Les inhibiteurs d'HPPD agissent sur les cellules végétales en inhibant la synthèse des plastoquinones et des caroténoïdes. Cette action conduit à un blanchiment des cellules végétales qui n'est pas dommageable à la croissances des dites cellules, plus particulièrement dans le cas de tissus embryogénique. Seules les cellules végétales transformées comprenant le gène de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD restent vertes et  
30 peuvent être sélectionnées, se distinguant ainsi des cellules non transformées.

La présente invention consiste en une amélioration d'une telle utilisation de manière à faciliter le processus d'identification et de sélection des cellules transformées. Un second objet de la présente invention consiste à diminuer le temps nécessaire à la sélection des plantes transformées, et à l'obtention de plantes régénérées fertiles. En effet, le processus

général de transformation, sélection, régénération et récupération des graines de plantes transformées fertiles peut prendre plusieurs mois selon les plantes considérées, de l'ordre de 10 à 18 mois, notamment pour des plantes telles que le soja. La réduction de cette durée de un ou plusieurs mois constitue un avantage technologique et économique certain.

- 5 La présente invention consiste introduire l'inhibiteur d'HPPD dans le milieu de culture des cellules végétales compétentes (étape a) de manière à blanchir les dites cellules avant l'étape de transformation. Les cellules compétentes blanchies sont ensuite transformées avec un gène de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD comme marqueur de sélection et les cellules transformées ayant intégré ledit marqueur de sélection dans leur
- 10 génome verdissent, permettant leur sélection. Un tel procédé permet de réduire le temps nécessaire à la sélection des cellules transformées de plusieurs mois, de l'ordre de 2 à 3 mois.

La présente invention consiste donc en un procédé de transformation de cellules végétales par l'introduction d'un gène hétérologue dans lesdites cellules végétales avec un

15 gène de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD comme marqueurs de sélection, ledit procédé comprenant les étapes de

- a) préparation et culture de cellules végétales compétentes aptes à recevoir le gène hétérologue dans un milieu approprié,
- b) transformation des cellules compétentes avec le gène hétérologue et le
- 20 marqueur de sélection,
- c) croissance et sélection des cellules transformées comprenant le gène hétérologue dans un milieu approprié.

caractérisé en ce que l'on effectue une étape de blanchiment des cellules végétales compétentes avant l'étape de transformation (b), en introduisant dans le milieu approprié

25 de culture des cellules végétales compétentes une quantité appropriée d'inhibiteur d'HPPD.

La présente invention consiste également en l'obtention de plantes transgéniques, comprenant le gène hétérologue intégré dans son génome, consiste ensuite à effectuer les étapes suivantes de :

- d) régénération de plantes à partir des cellules transformées sélectionnées dans
- 30 un ou plusieurs milieux appropriés, et le cas échéant,
- e) obtention et récupération des graines des plantes transformées fertiles.

De manière préférentielle les plantes transgéniques obtenues par le procédé selon l'invention sont des plantes transgéniques fertiles.

Les cellules végétales selon l'invention peuvent être des cellules végétales de plantes monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, de préférence dicotylédones, notamment le tabac, le colza, la betterave à sucre, les pommes de terre, le coton, ou le soja, de manière plus préférentielle le soja.

Les cellules végétales compétentes peuvent être des cals embryogéniques, des cultures cellulaires sur support solide ou en suspension, ou des tissus embryogéniques, bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature. De manière avantageuse, les cellules végétales compétentes sont des tissus embryogéniques prolifératifs, maintenus préférentiellement dans un milieu semi solide (In Vitro Cell. Dev. Bioll. Plant 35 :451-455, 1999), et plus particulièrement de cellules de soja. Pour ces cellules compétentes, le blanchiment in vitro lié à l'inhibition de la synthèse des tocophérols n'est pas létale et ne diminue pas la division cellulaire.

La présente invention concerne plus particulier un procédé de préparation d'un soja transgénique comprenant un gène hétérologue intégré dans son génome, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- a1) préparation de tissus embryogéniques prolifératifs par culture d'embryons zygotiques immatures de soja sur un milieu inducteur approprié,
- a2) transfert des tissus embryogéniques prolifératifs dans un milieu de culture approprié,
- a3) blanchiment des tissus embryogéniques prolifératifs par ajout d'une quantité appropriée d'inhibiteur d'HPPD au milieu de culture,
- b) transformation des tissus embryogénique prolifératifs blanchis par bombardement de particules enrobées de fragments d'ADN comprenant le gène hétérologue et le gène de résistance aux inhibiteurs d'HPPD.
- c) croissance et sélection des cellules transformées comprenant le gène hétérologue et le gène de résistance aux inhibiteurs d'HPPD dans un milieu de culture approprié comprenant une quantité appropriée d'inhibiteur d'HPPD,
- d) régénérations de plantes à partir des cellules transformées sélectionnées dans un ou plusieurs milieux appropriés,
- e) obtention et récupération de graines de soja transformés fertile comprenant le gène hétérologue et le gène de résistance aux inhibiteurs d'HPPD.

De manière avantageuse, les inhibiteurs d'HPPD sont choisis parmi les isoxazoles (EP 418 175, EP 470 856, EP 487 352, EP 527 036, EP 560 482, EP 682 659, US 5 424

276) en particulier l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631), en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub> phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-2,3 Cl<sub>2</sub> phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195), en particulier la  
 5 sulcotrione ou la mésotrione, ou encore les pyrazolines. De manière préférentielle, l'inhibiteur d'HPPD est choisi parmi les dikétonitriles, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub> phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-2,3 Cl<sub>2</sub> phényl) propane-1, 3-dione.

La quantité appropriée d'inhibiteur d'HPPD introduite dans le milieu approprié de  
 10 préparation et de culture des cellules compétentes selon l'invention dépendra d'une part de l'inhibiteur d'HPPD employé et d'autre part des cellules compétentes employées, de par leur plante d'origine et leur forme. L'homme du métier saura déterminer cette quantité appropriée par des techniques usuelles de croissance des cellules compétentes à différentes concentrations de l'inhibiteur d'HPPD employé.

15 De manière préférentielle, la concentration en inhibiteurs d'HPPD est comprise entre 0,5 et 50 mg de matière active par litre de milieu, plus préférentiellement comprise entre 1 et 10 mg/l.

De manière avantageuse, l'inhibiteur d'HPPD est appliqué aux cellules végétales compétentes dans le milieu de culture entre 1 mois et 1 semaines, avant l'étape de  
 20 transformation, préférentiellement entre 15 et 10 jours. L'homme du métier saura déterminer le moment d'application de l'inhibiteur d'HPPD avant la transformation en fonction des tissus à transformer et de l'inhibiteur d'HPPD et de sa concentration, et de la cinétique de blanchiment des tissus. Il est commun aux techniques de transformation de cellules végétales que les cellules végétales compétentes doivent être repiquées de manière  
 25 régulière dans des milieux de culture frais. Le temps entre chaque opération de repiquage dépendra en particulier du milieu de culture et de la vitesse de croissance des cellules végétales. Il est généralement de 10 à 15 jours. De manière avantageuse, l'inhibiteur d'HPPD sera introduit dans le milieu de culture frais avant de procéder au repiquage des cellules, généralement au cours du dernier repiquage précédant l'étape de transformation.

30 Les milieux appropriés pour la préparation et la culture des cellules végétales compétentes comme les milieux appropriés pour la croissance et la sélection des cellules transformées et les milieux pour la régénération des plantes transformées sont des milieux usuels bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature et notamment dans les références citées dans la présente demande de brevet.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, le milieu approprié pour la préparation et la culture des cellules végétales compétentes et le milieu approprié pour la croissance et la sélection des cellules transformées sont identiques et comprennent la même concentration en inhibiteur d'HPPD. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, ils ne diffèrent que de par leur concentration en inhibiteur d'HPPD, le premier milieu comprenant une concentration en inhibiteur supérieure au second ou l'inverse. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les milieux diffèrent de par leur composition en éléments nutritifs et hormones nécessaire à la croissance des cellules compétentes avant et après transformation. De manière préférentielle, les deux milieux sont identiques de par leur composition en éléments nutritifs et hormones et leur concentration en inhibiteurs d'HPPD.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, le milieu approprié pour la préparation et la culture des cellule compétentes et/ou le milieu approprié pour la croissance et la sélection des cellules transformées est un milieu D20 décrit Santarém et Finer (In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 35 : 451-455, 1999), au quel on ajoute une quantité appropriée d'inhibiteur d'HPPD.

Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, le milieu approprié pour la préparation et la culture des cellule compétentes et/ou le milieu approprié pour la croissance et la sélection des cellules transformées est un milieu FNL décrit par Samoylov & coll. (Plant Cell. Rep., 18 :49-54, 1998), dont la composition détaillée est donnée dans les exemples ci-après, auquel on ajoute une quantité appropriée d'inhibiteur d'HPPD. De manière préférentielle, les deux milieux sont des milieux FNL.

Le milieu inducteur approprié est de préférence un milieu D40 tel que défini dans les exemples.

Le milieu de régénération approprié est de préférence un milieu SBP6 décrit par Finer & Nagasawa (Plant Cell. Tissue and Organ Culture 15 : 125-136, 1988) défini dans les exemples ci-après pour la croissance des tissus, puis un milieu tel que décrit par Finner & McMullen (In Vitro Cell. Dev. Biol. 27P :175-182, 1991) pour la conversion des tissus en embryons, puis un milieu MS, en particulier un milieu MS tel que décrit dans les exemples pour la germination des embryons.

Il est entendu dans de qui précède et ce qui suit que lorsque le gène hétérologue que l'on souhaite introduire dans la plante est un gène de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD, seul le gène de résistance aux inhibiteurs d'HPPD est introduit dans les cellules végétales.



Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, l'étape de transformation des cellules compétentes (étape b) est effectuée par la méthode de bombardement de particules, étant entendu que d'autres méthodes équivalentes de transfert d'ADN nu comme l'agitation des cellules compétentes en présence d'ADN et de fibres de silices (Whiskers) peuvent être employées. Le principe de la transformation par bombardement de particules est bien connu de l'homme du métier et largement décrit dans la littérature pour différentes espèces de cellules végétales et de plantes. Pour la transformation des plantes dicotylédones, et du soja en particulier, on citera notamment les références suivantes : Finer & coll. (Plant Cell. Rep. 11 :323-328, 1992). La transformation par bombardement de particules consiste essentiellement à agréger des fragments d'ADN comprenant les gènes à transférer sur des particules métalliques qui sont ensuite bombardées sur les cellules végétales compétentes au moyen de canons à particules. Les particules comme les appareils permettant le bombardement des cellules compétentes sont bien connus de l'homme du métier, décrits dans la littérature et disponibles dans le commerce. On citera notamment les brevets et demandes de brevet US 4 945 050, EP 270 356, US 5 204 253, EP 434 616, US 5 516 670, EP 535 005 ou US 5 466 587. Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les particules métalliques sont des particules fonctionnalisées par le greffage de silicones aminées telles que décrites dans le brevet US 6 068 980.

De manière préférentielle, les gènes de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD comprennent dans le sens de la transcription une séquence de régulation promotrice fonctionnelle dans les cellules végétales et les plantes, liée de manière fonctionnelle à une séquence d'ADN codant pour une HPPD liée de manière fonctionnelle à une séquence de régulation terminatrice fonctionnelle dans les cellules végétales et les plantes. Les séquences codant pour des HPPD sont des séquences d'HPPD natives, notamment de plantes, de microorganismes, de champignons ou de mammifères, notamment les séquences décrites dans les demandes de brevet WO 96/38567, US 6 087 563, WO 97/49816 ou WO 99/24585. Il s'agit notamment de séquences codant pour des HPPD de *Pseudomonas fluorescens*, d'*Arabidopsis thaliana*, de carotte, de blé, de *Synechocystis*. Les séquences codant pour des HPPD sont également des séquences mutées dans leur partie C-terminale telles que décrites dans la demande de brevet WO 99/24585 ou des HPPD chimères telles que décrites dans la demande de brevet WO 99/24586. Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la séquence d'ADN codant pour une HPPD est une séquence d'HPPD mutée dans sa partie terminale, plus particulièrement une séquence comprenant la mutation W336 telle que décrite dans la demande de brevet WO 99/24585,

plus préférentiellement la séquence d'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* comprenant la mutation W336 telle que décrite dans la demande de brevet WO 99/24585.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, le gène de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD comprend dans le sens de la transcription une séquence de régulation promotrice sélectionnée parmi le promoteur de la petite sous unité de la RuBisCo de tournesol, décrit dans la demande de brevet WO 99/25842, ou le promoteur d'histone d'*Arabidopsis thaliana* combiné à l'enhancer du virus etch du tabac (TEV) te que décrit dans la demande de brevet WO 99/24585, liée de manière fonctionnelle à une séquence d'ADN codant pour une peptide de transit, de préférence un peptide de transit optimisé, tels que définis ci-après, liée de manière fonctionnelle à une séquence d'ADN codant pour une HPPD telle que définie ci-dessus, de préférence une séquence codant pour une HPPD de *Pseudomonas fluorescens* comprenant la mutation W336, liée de manière fonctionnelle à une séquence de régulation terminatrice, en particulier la séquence terminatrice NOS définie ci-après. Les gènes de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD correspondants sont représentés dans les figures en annexe par les cartes de plasmides pCH73 et pCH94, et par leurs séquences nucléotidiques :

pCH73 : SEQ ID NO 1, représentation 3'-5'

Promoteur : 4541-5257

Peptide de transit optimisé : 4130-4487

HPPDW336 : 3045-4119

NOS : 2749-3000

PCH94 : SEQ ID NO 2

Promoteur : 34-1272

TEV enhancer : 1292-1421

Peptide de transit optimisé : 1428-1793

HPPDW336 : 1795-2869

NOS : 2914-3165

De manière préférentielle, les gènes hétérologues codant pour une protéine d'intérêt comprennent dans le sens de la transcription une séquence de régulation promotrice fonctionnelle dans les cellules végétales et les plantes, liée de manière fonctionnelle à une séquence d'ADN codant pour une protéine ou un peptide d'intérêt liée de manière fonctionnelle à une séquence de régulation terminatrice fonctionnelle dans les cellules végétales et les plantes.

Les séquences d'ADN codant pour une protéine ou un peptide d'intérêt sont généralement des séquences codant pour des protéines ou des peptides conférant à la plante transformée de nouvelles propriétés agronomiques, ou d'amélioration de la qualité agronomique de la plante transformée.

5 Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer les séquences d'ADN codant pour des protéines conférant une tolérance à certains herbicides, ceux conférant une résistance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies, etc. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128.

10 Parmi les séquences d'ADN codant pour des protéines conférant une tolérance à certains herbicides aux cellules végétales et aux plantes transformées., on peut citer le gène Bar conférant une tolérance au bialaphos, le gène codant pour une EPSPS appropriée conférant une résistance aux herbicides ayant l'EPSPS comme cible comme le glyphosate et ses sels (US 4,535,060, US 4,769,061, US 5,094,945, US 4,940,835, US 5,188,642, US 15 4,971,908, US 5,145,783, US 5,310,667, US 5,312,910, US 5,627,061, US 5,633,435, FR 2 736 926), le gène codant pour la glyphosate oxydoréductase (US 5,463,175), ou encore un gène codant pour une HPPD conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible l'HPPD cités précédemment comme les isoxazoles, notamment l'isoxafutole (FR 95 06800, FR 95 13570), les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631) ou les tricétones, 20 notamment la sulcotrione ou la mésotrione (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195).

Parmi les séquences d'ADN codant pour une EPSPS appropriée conférant une résistance aux herbicides ayant l'EPSPS comme cible, on citera plus particulièrement le gène codant pour une EPSPS végétale, en particulier de maïs, présentant deux mutations 102 et 106, décrit dans la demande de brevet FR 2 736 926, dénommé ci-dessous EPSPS 25 double mutant, ou encore le gène codant pour une EPSPS isolée d'*Agrobacterium* décrit par les séquences ID 2 et ID 3 du brevet US 5,633,435, dénommé ci-dessous CP4.

Dans les cas des séquences d'ADN codant pour EPSPS ou HPPD, et plus particulièrement pour les gènes ci-dessus, la séquence codant pour ces enzymes est avantageusement précédée par une séquence codant pour un peptide de transit, en 30 particulier pour le peptide de transit dit peptide de transit optimisé décrit dans les brevets US 5,510,471 ou US 5,633,448.

Parmi les séquences d'ADN codant pour des protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux insectes, on citera plus particulièrement les protéines Bt largement décrites dans la littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera

aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photobacterium* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

Parmi les séquences d'ADN codant pour des protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences  
 5 codantes étant largement décrites dans la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les  
 10 cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et WO 99/09189), la drosomicine (WO 99/02717), la thanatine (WO 99/24594) ou l'héliomicine (WO 99/53053). Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines (Kamoun & al., 1993 ; Panabières  
 15 & al., 1995).

Parmi les séquences d'ADN codant pour des protéines ou peptides modifiant la constitution des plantes modifiées, on peut citer en particulier les séquences d'ADN codant pour des protéines ou peptides modifiant en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en  
 20 particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés (Korit, A.A. & al., Eur. J. Biochem. (1991) 195, 329-334 ; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire,  
 25 permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute  
 30 origine, et plus particulièrement les peptides lytiques décrits précédemment. On citera également les protéines SAT décrites dans les demandes de brevet WO 00/36127, WO 00/04167 et WO 00/01833.

Comme séquence de régulation promotrice dans les cellules végétales et les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les

plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale ou encore des promoteurs dits lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose- biscoxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante ou tout

5 promoteur convenable connu pouvant être utilisé. Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera les promoteurs d'histone tels que décrits dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'actine de riz (US 5,641,876). Parmi les promoteurs d'un gène de virus de plante, on citera celui de la mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), ou le promoteur du circovirus (AU 689 311).

10 On peut encore utiliser une séquence de régulation promotrice spécifique de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines ([22] Datla, R.& al., Biotechnology Ann. Rev. (1997) 3, 269-296), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 98/45460), de l'oélosine (WO

15 98/45461), de l'ATS1 ou de l'ATS3 (PCT/US98/06978, déposée le 20 octobre 1998, incorporée ici par référence).

On peut également employer un promoteur inductible avantageusement choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinasés, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1,

20 de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB (US 5 670 349, Tableau 3), le promoteur HMG2 (US 5 670 349), le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'acido cyclopropane carboxylate synthase (ACC synthase) de pomme (WO 98/45445).

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec le promoteur la

25 séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (VET) décrit par Carrington & Freed, ou des introns comme l'intron adh1 de maïs ou l'intron 1 d'actine

30 de riz.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'origine virale, comme par exemple le terminateur du

CaMV 35S, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Les séquences codant pour une HPPD comme les séquences codant pour une protéine ou un peptide d'intérêt peuvent comprendre, liés de manière fonctionnelle en 5' ou en 3' des séquences codant pour des signaux d'adressage dans différents compartiments de la cellule végétale, comme les chloroplastes, les mitochondries, la vacuole. De tels signaux sont décrits dans la littérature et bien connus de l'homme du métier. Les peptide de transit chroloplastiques peuvent être simples, comme un peptide de transit d'EPSPS (US 5,188,642) ou un peptide de transit de celui de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (ssu RuBisCO) d'une plante, éventuellement comprenant quelques acides aminés de la partie N-terminale de la ssu RuBisCO mature (EP 189 707) ou encore un peptide de transit multiple comprenant un premier peptide de transit de plante fusionné à une partie de la séquence N-terminale d'une protéine mature à localisation plastidiale, fusionnée à un deuxième peptide de transit de plante tel que décrit dans le brevet EP 508 909, et plus particulièrement le peptide de transit optimisé comprenant un peptide de transit de la ssu RuBisCO de tournesol fusionné à 22 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la ssu RuBisCO de maïs fusionnée au peptide de transit de la ssu RuBisCO de maïs tel que décrit avec sa séquence codante dans le brevet EP 508 909.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention pour la transformation du soja, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al, publiés par Greene Publishing Associates et Wiley -Interscience (1989) ou dans Molecular cloning, T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook, 1982.

Le contenu de toutes les références citées dans la description ci-dessus et dans les exemples ci-après est incorporé au contenu de la présente demande de brevet par référence.

### **Exemple 1 : Technologie de transformation du soja**

La technologie employée pour la transformation du soja a été décrite par Santarém & Finer: Transformation of soybean (Glycine max (L.) Merrill) using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 35 : 451-455, 1999. Elle comprend les étapes ci-après.

Des embryons immatures zygotiques (de 3 à 4 mm) sont disséqués de manière aseptisée et placés le côté adaxial sur le dessus dans un milieu comprenant du 2,4D (D40).

D 40 est un milieu Murashige and Skoog décrit dans : Murashige & Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497; 1962. (mg/l) :  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ : 1650,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 6,2;  $\text{CaCl}_2$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$ : 332,2;  $\text{CoCl}_2$ ,  $6\text{H}_2\text{O}$ : 0,025;  $\text{CuSO}_4$ ,  $5\text{H}_2\text{O}$ : 0,025;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ : 37,26;  $\text{FeSO}_4$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$ : 27,8;  $\text{MnSO}_4$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$ : 16,9;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$ : 0,25;  $\text{KI}$ : 0,83;  $\text{KNO}_3$ : 1900;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 170;  $\text{ZnSO}_4$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$ : 8,6 avec de la vitamine B5 Gamborg décrite par : Gamborg, Miller and Ojima: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50 : 151-158, 1968 : (mg/l) : myo-inositol: 100; Nicotinic acid: 1; Pyridoxine-Hcl: 1; Thiamine-Hcl: 10; and 40 mg/l of 2,4-D and 6% sucrose; 0,3% gelrite, pH 7,0.

Après 3 semaines de culture en milieu D40, les cotylédons sont transférés sur un milieu D20 qui comprend essentiellement les même éléments que le milieu D40, à l'exception de la concentration en 2,4D qui est abaissée à 20 mg/l et de la concentration en saccharose qui est abaissée de 60 g/l à 30 g/l, à pH 5,7.

Sur ce milieu, les embryons somatiques commencent à proliférer sous forme de d'agrégats compacts, ou « clumps ». Les « clumps » embryogéniques sont ensuite transférés tous les 15 jours sur un nouveau milieu D 20 pour augmenter la production de tissus. Cinq ou six transferts (environ 3 mois) sur ce milieu sont nécessaires pour optimiser leur compétence à la transformation. L'emploi de tissus embryogéniques à un stade plus précoce conduit à des résultats beaucoup plus faibles.

#### Transformation des tissus

Le bombardement de particules est employé pour la transformation des tissus embryogéniques.

Préparation des particules: Des particules de tungstène fonctionnalisées (M17) sont préparées selon le brevet US 6 068 980. Les particules sont fonctionnalisées par greffage de silicones aminées comme élément de vectorisation et lavées dans l'éthanol absolu. 2,5 mg de particules dans l'éthanol sont mélangés avec 3  $\mu\text{g}$  d'ADN. Après précipitation ; les particules sont pipetées et employées pour deux tirs avec un canon à particules de type PIG décrit par Finer, Vain, Lones and McMullen dans : Development of the Particle Inflow Gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.* 11 : 323-328, 1992.

Avant le bombardement, les tissus sont séchés sous vide sous une hotte laminaire pendant 5 à 10 mn, puis placés entre deux écrans de 500  $\mu\text{m}$  puis bombardés deux fois.

Après le bombardement, les tissus sont transférés deux fois sur milieu D20 (2x10 jours) avant de débiter la sélection par l'hygromycine (30 mg/l).

De manière à éviter la manipulation de tissus et de gagner du temps, les cals bombardés sont placés sur un écran de gaze stérile fixé par deux anneaux métalliques (figure 2) qui permettent un contact direct entre les tissus embryogéniques et le milieu solide. Les écrans de gaze sont transférés sur des milieux frais chaque 15 jours jusqu'à ce que des cals verts soient observés. Il est entendu que le principe de transfert de cals décrit ci-dessus n'est pas limité aux cals de soja et à la sélection par l'hygromycine, mais peut être employé pour tout procédé de culture de tissus et de suspensions cellulaires nécessitant un changement fréquent de milieu de culture.

#### Amplification et Régénération des tissus

Les cals verts qui poussent sur milieu comprenant de l'hygromycine sont amplifiés pendant 1 mois sur milieu SBP6 décrit par Finer & Nagasawa dans : Development of an embryogenic suspension culture of soybean (Glycine max Merrill.) Plant Cell. Tissue and Organ Culture 15 : 125-136, 1988 (mg/l) : Na<sub>2</sub>EDTA: 37,24; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 27,84; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 370; MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O: 16,9; ZnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O: 8,6; CuSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,025; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O: 440; KI: 0,83; CoCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O: 0,025; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 170; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 6,2; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O: 0,25; myo-inositol: 100; nicotinic acid: 1; pyridoxine-HCL: 1; thiamine-HCL: 10; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 800; KNO<sub>3</sub>: 3000; asparagine: 670; 6% sucrose; 2,4-D: 5, pH 5,7.

Lorsque suffisamment de tissus sont produits, ils sont ensuite convertis en embryons en employant un milieu décrit par Finer & McMullen dans : Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. In Vitro Cell. Dev. Biol. 27P : 175-182, 1991.

Après 3-4 transferts sur ce milieu, les embryons sont séchés à l'air dans une boîte de Petri pendant 2 jours avant germination sur un milieu Murashige & Skoog (vitamines B5) à demi force avec 15 g/l de saccharose, 7g/l de phytagar, pH 5,7.

Lorsque les plantes sont bien développées, elles sont transférées dans un substrat à base de tourbe "jiffy pot" pour une période de 10 jours pour acclimatation avant d'être transférées en serre.

Cette technologie employant l'écran de gaze et la sélection par l'hygromycine permet de régénérer 200 cals par personne et par an.

#### Exemple 2 : Transformation des tissus selon l'invention



Le même procédé de sélection a été développé pour les inhibiteurs d'HPPD avec un milieu D20 comprenant 2 mg/l d'isoxaflutole ou 0,5 à 5 mg/l de dikétonitriles. Le gène de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD employé comme marqueur de sélection est le pCH73 ou le pCH94 représentés sur la figure 1.

5 10 à 15 jours précédant le bombardement, on introduit dans le milieu D20 l'isoxaflutole ou les dikétonitriles aux concentrations précitées de manière à blanchir les tissus. Après bombardement, les tissus sont placés directement dans le même milieu D20 comprenant 2mg/l d'isoxaflutole ou de dikétonitrile (entre 0,5 to 5 mg/l) et transférés dans un milieu frais tous les 15 jours. Après 4 transferts sur l'isoxaflutole, des cals verts sont  
10 identifiés et amplifiés comme décrit dans l'exemple 1. Le temps nécessaire à l'obtention de cals de cellules compétentes pour le bombardement est de 3 mois et demi. La sélection des cellules transformées (cals verts) intervient environ 6 mois suivant l'initiation des cals pour la transformation (figure 3).

Lorsque les tissus sont transférés pour sélection sur l'isoxaflutole, ils sont rapidement  
15 blanchis par l'herbicide, sans observer d'inhibition de la croissance. Ceci est dû au fait que l'absence de caroténoïdes, de chlorophylle et de tocophérols n'est pas indispensable à la croissance des tissus.

Les résultats obtenus avec et sans blanchiment préalable sont représentés dans le Tableau 1 ci-après.

20

**Tableau 1 : transformation sur milieu D20**

Blanchiment	PCH73			PCH94		
	1	2	3	1	2	3
<b>Essai</b>	1	2	3	1	2	3
<b>Avant Bombardement</b>	0	0,5	0,25	0,67	1	2
<b>Après Bombardement</b>	0	0	0,25	0,67	0,33	0,25

Ils montrent, en particulier pour le pCH94 un plus grand nombre de cals identifiés en amorçant la sélection avant le bombardement selon l'invention. Ce plus grand nombre de  
25 cals sélectionnés est lié à l'amélioration du processus de sélection selon l'invention, en facilitant l'identification des cals transformés.

### **Exemple 3 : Choix du milieu**

De manière à améliorer le processus de sélection selon l'invention, on a cherché à  
30 diminuer le nombre de transfert de tissus et le temps nécessaire à l'obtention de cals de

cellules compétentes et de cals verts sélectionnés après bombardement. A cet effet, le milieu D20 employé précédemment a été remplacé par un milieu FNL modifié, lequel permet une prolifération rapide des tissus.

- Le milieu FNL a été décrit par Samoylov, Tucker, Thibaud-Nissen & Parrott dans :
- 5 A liquid-medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures: Plant Cell Rep, 18 : 49-54, 1998.

Ce milieu permet d'obtenir plus rapidement des tissus prêts au bombardement, une plus grande embryogénie et des cycles de transfert plus courts.

- Composition du milieu FNL (mg/l): Na2EDTA: 37,24; FeSO4, 7H2O: 27,84; 10 MgSO4, 7H2O: 370; MnSO4, H2O: 16,9; ZnSO4, H2O: 8,6; CuSO4, 7H2O: 0,025; CaCl2, 2H2O: 440; KI: 0,83; CoCl2, 6H2O: 0,025; KH2PO4: 170; H3BO3: 6,2; Na2MoO4, 2H2O: 0,25; myo-inositol: 100; nicotinic acid: 1; pyridoxine-HCL: 1; thiamine-HCL: 10; (NH4)2SO4: 460; KNO3: 2820; asparagine: 670; 1% sucrose; 2,4-D: 10; 0,3% gelrite; pH 5,7.

- 15 Toutefois, en l'absence de blanchiment préalable, la quantité de tissus à manipuler pendant le processus de sélection reste trop importante, comparable à celle du milieu D20 du fait de la vitesse importante de leur développement.

- Le bombardement de tissus blanchis par l'isoxaflutole selon l'invention ne nécessite qu'un seul transfert de cals avant d'obtenir les cals verts sélectionnés, contre 4 en 20 employant le milieu D20.

Le temps nécessaire à l'obtention de cals de cellule compétentes pour le bombardement est de 2 mois, les cals transformés verts étant sélectionnés environ 3 mois suivant l'initiation des cals pour la transformation (figure 3).

- Les résultats de transformation avec les plasmides pCH73 et pCH94 sont reportés sur 25 le tableau 2 ci-après.

**Tableau 2 : Transformation sur milieu FNL**

Blanchiment	pCH73			PCH94			
	1	2	3	1	2	3	4
<b>Essai</b>	1	2	3	1	2	3	4
<b>Avant Bombardement</b>	1	1,5	0,33	1	1	0,33	1,5
<b>Après Bombardement</b>	0,25	0	-	-	-	-	-

- . Le nombre moyen de cals verts sélectionnés par essai de transformation en employant les tissus blanchis selon l'invention est de 1 par tir. Ce tableau montre 30 également qu'avec le blanchiment préalables des tissus, on obtient les même fréquences de

transformation pour les deux gènes pCH73 et pCH94, alors que le promoteur ssu RuBisCo de pCH73 est connu pour avoir une expression faibles dans les cals in vitro, contrairement au promoteur d'histone de pCH94.

- 5 L'emploi du milieu FNL en combinaison avec le blanchiment préalable des tissus selon l'invention permet de diminuer de manière substantielle le temps nécessaire à la sélection des cals verts et la charge de travail pour tout le processus de transformation des plantes.

## Revendications

1. Procédé de transformation de cellules végétales par l'introduction d'un gène hétérologue dans lesdites cellules végétales avec un gène de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD comme marqueur de sélection, ledit procédé comprenant les étapes de
  - a) préparation et culture de cellules végétales compétentes aptes à recevoir le gène hétérologue dans un milieu approprié,
  - b) transformation des cellules compétentes avec le gène hétérologue et le marqueur de sélection,
  - 10 c) croissance et sélection des cellules transformées comprenant le gène hétérologue dans un milieu approprié.

caractérisé en ce que l'on effectue une étape de blanchiment des cellules végétales compétentes avant l'étape de transformation (b), en introduisant dans le milieu approprié de culture des cellules végétales compétentes une quantité appropriée d'inhibiteur d'HPPD.
- 15 2. Procédé de préparation de plantes transgéniques, comprenant un gène hétérologue intégré dans son génome, comprenant un procédé de transformation de cellules végétales selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste ensuite à effectuer les étapes suivantes de :
  - d) régénération de plantes à partir des cellules transformées sélectionnées dans un ou
  - 20 plusieurs milieux appropriés, et le cas échéant,
  - e) obtention et récupération des graines des plantes transformées fertiles.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les plantes transgéniques obtenues par le procédé selon l'invention sont des plantes transgéniques fertiles.
- 25 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les cellules végétales sont choisies parmi les cellules de plantes dicotylédones, notamment le tabac, le colza, la betterave à sucre, les pommes de terre, le coton, ou le soja.
5. procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que les cellules végétales sont des cellules de soja.
- 30 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les cellules végétales compétentes sont choisies parmi les cals embryogéniques, les cultures cellulaires sur support solide ou en suspension, ou les tissus embryogéniques.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les cellules végétales compétentes sont des tissus embryogéniques proliférants.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les tissus embryogéniques proliférants sont maintenus dans un milieu semi solide.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le milieu semi solide est un milieu FNL.

5 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'inhibiteur d'HPPD est choisis parmi les isoxazoles, en particulier l'isoxaflutole, les dicétonitriles, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub> phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-2,3 Cl<sub>2</sub> phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones, en particulier la sulcotrione ou la mésotrione, ou les  
10 pyrazolines.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la concentration en inhibiteurs d'HPPD est comprise entre 0.5 mg/l et 50 mg/l, plus préférentiellement comprise entre 1 mg/l et mg/l.

12. Procédé de préparation de plantes transgéniques, comprenant un gène  
15 hétérologue intégré dans leur génome, lequel procédé comprend un procédé de transformation de cellules végétales par l'introduction d'un gène hétérologue dans lesdites cellules végétales avec un gène de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD comme marqueur de sélection, ledit procédé comprenant les étapes de

- a) préparation et culture de cellules végétales compétentes aptes à recevoir le gène  
20 hétérologue dans un milieu approprié,
- b) transformation des cellules compétentes avec le gène hétérologue et le marqueur de sélection,
- c) croissance et sélection des cellules transformées comprenant le gène hétérologue dans un milieu approprié.
- 25 d) régénération de plantes à partir des cellules transformées sélectionnées dans un ou plusieurs milieux appropriés, et le cas échéant,
- e) obtention et récupération des graines des plantes transformées fertiles, puis

obtention de nouvelles variétés de plantes transgéniques ayant intégré le gène hétérologue de manière stable dans leur génome dans des programmes de sélection  
30 classique

caractérisé en ce que l'on effectue une étape de blanchiment des cellules végétales compétentes avant l'étape de transformation (b), en introduisant dans le milieu approprié de culture des cellules végétales compétentes un quantité appropriée d'inhibiteur d'HPPD.

13. Procédé selon l'une des revendications 2 à 12, caractérisé en ce que le gène marqueur de sélection est éliminé par croisement des plantes transformées comprenant le gène hétérologue et le gène marqueur de sélection avec une variété non transformée de la même plante.

## **AVENTIS CROPSCIENCE SA**

### **Utilisation d'inhibiteurs d'HPPD comme agents de sélection dans la transformation de plantes**

#### **Abrégé Descriptif :**

La présente invention concerne un procédé de transformation de cellules végétales par l'introduction d'un gène hétérologue dans lesdites cellules végétales avec un gène de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD comme marqueur de sélection, ledit procédé comprenant les étapes de

- f) préparation et culture de cellules végétales compétentes aptes à recevoir le gène hétérologue dans un milieu approprié,
- g) transformation des cellules compétentes avec le gène hétérologue et le marqueur de sélection,
- h) croissance et sélection des cellules transformées comprenant le gène hétérologue dans un milieu approprié.

caractérisé en ce que l'on effectue une étape de blanchiment des cellules végétales compétentes avant l'étape de transformation (b), en introduisant dans le milieu approprié de culture des cellules végétales compétentes une quantité appropriée d'inhibiteur d'HPPD.

# LISTE DE SEQUENCES

<112> Aventis CropScience S.A.

<120> Utilisation d'inhibiteurs d'HPPD comme agents de  
sélection dans la transformation des plantes

<141>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5281

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: gène  
chimère

<400> 1

```

atagtgtgccc caagcgtgat atcatcatg ttaacatcga tccatgggag cgccttaatt 60
aaatttaaatt cagctgcatt aatgaatcgg ccaacggcgg gggagaggcg gtttgcgat 120
tgggagctct tccgttccct cgtcactga ctgctggcgc tgggtcggtc ggctgcggcg 180
agggttatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 240
aggaaagaac atgtgagcaa aagggcagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt 300
cttgggtttt ttccataggg tcccccctcc tgaagagcat cacaaaaatc gacgtcaag 360
ttgaggtggc agaaaaccca cagaaatata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 420
cttctggcgc tctctgttcc agacccctgc gcttaaccga taactgtccg cttttctccc 480
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgtgttagg tatctcagtt cgggtgtaggt 540
cgttccctcc aagctgggct gtgtgcagca acccccggtt cagcccgacc gctgggcctt 600
atccgttaac tatgtttttg agtccaaacc ggtaagacac gaattatcgc caactggcagc 660
tgcacttggt aacaggatta gcagagcgag gtatgttaggc ggtgctacag agttcttgaa 720
gtgttggtct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctggc ctctgctgaa 780
ggtagtacc ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccacgcgtgg 840
taccgttggt ttttttgttt gaaagcagca gattacggcg agaaaaaag gatctcaaga 900
agctcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtggc aacgaaaact caagtttaagg 960
gatttggttc atgagattat caaaaaggat ctccacctag atccttttaa attaaaaatg 1020
aatgttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaccttg tctgacagtt accaatgctt 1080

```



aatcagtgag gaactatct cagcgatctg tctatttctg toatccatag ttgcctgaat 1140  
cctgtctgt; tagataacta cgatacggga ggccttaacca tctgypccca gtgctgcaat 1150  
gatacggca gacccacgct caccggcttc agattttatca gcaatcaaac agccagctgg 1160  
aagggcogag ggcagaagtg gtcttgcac tttatccgac tccatccagt ctattaaatg 1170  
ttgcgggga gctagagtaa gtagtctg acntaatagt ttggggaacg ttgttgcaat 1180  
tgctacaggg atgtggtgt cagctctgt gtttggtatg gcttattca gctcggcttc 1190  
ccaaagatca aggcaggtta catgatccc catgttctgc aaaaaaggg ttgctcttc 1200  
cgtctctcg atgtttgtca gaagtaagtt ggcgcagtg ttatctca tggttatggc 1210  
agcactgcat aattctotta ctgtcatgac atccgtaaga tgccttctc tgaactgca 1220  
gtaaccaac aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgt ctgcccggg 1230  
gtcaatacgg gataatacgg cgcacatag cagaacttta aaagtgtca tcaattgaaa 1240  
acgttcttcy ggcggaaaaa tctcaaggat ctacccgctg ttgagatca gtcagatgta 1250  
acccactcgt gaacccagct gatcttcagc atctcttaact tccacagcg ttcttgggtg 1260  
aaccaaaaa ggaaggcaaa atgcgcgaaa aaagggaata aggcgcgac ggaactgtg 1270  
aatatcata ctcttcttt tcaatatta tgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 1280  
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 1290  
tcccggaaaa gtgcacactg acgcgcctg tagcggcga ttaagcggg cgggtgtgt 1300  
ggttaacggc agcgtgacgg ctacactgc cagcgccta ggcgcgcctc ctttgcctt 1310  
ctctcttcc ttctcgca cgttcgcgg cttcccccgt caagctctaa atcggggat 1320  
cccittaggg ttcgattta gtgctttag gcaactcga cccaaaaa ttgattatgg 1330  
tgaatgttca cgtagtggc catcgctgt atagacggt ttctgcctt tgaacttga 1340  
gtccacgttc tttaatagt gactcttctt ccaactgga acaactca accatcttc 1350  
ggtctattct ttgatttat aagggtctt gcgatttct gctatctgt taaaaaatga 1360  
gctgatttaa caaaaattta acgcgaatt taacaaaaa ttaacpcta caattctcat 1370  
tcgcattca ggcgcgcaa ctgttgga ggcacatgg tccgcctc ttcttatta 1380  
cgcagctgg gcaactgtg ggaaggcga tgggtgcgg cctcttctt attacgctg 1390  
ctggcgaaag ggggatgtg tgcgaaggga ttaagtggg taacgcaggg gttttccag 1400  
tcaggaagtt gtaaacgac ggcagtgaa ttgcggcgc aattccgat ctagnaant 1410  
agatgacac ggcgcgata atttatcta ctttcgcgc tataattgt ttctatcgc 1420  
gtaaaag tatatttgc cactctcat caaaaaaac catctcaca atcaagtcat 1430  
gtaaaag ttaattata catgtttac ttaattcaac ngaaattata tgaatttat 1440  
cgtagagtg gaaacagat tcaattctaa gaaactttat tgcacaaat ttgaatgato 1450  
gggaaattc gtgagtcac cctcggcgg gctttttgac gcttaacgg cgttaattac 1460  
aacgcagac acccggctac gctcgttga ctggaacag gcttgaagt tccactcgc 1470  
aaacccatg tgcctctgc gctgttga ttgcagaac acggggcca tccaggttcc 1480  
cgtagaagtc tgcagcaga ggcgtttgt gcttccacg gaagatcgt ccagaggtat 1490  
acgggtgac tgcagttgat ccaacggctc ggcgtgtca ggcaggcgc ctctgagat 1500  
ttcgaataa gtgtctggt ggcgggtcat gaggcagat ccattttct tcaacggtc 1510  
ccaggtctg accaggtgt cgttgcgaa ggcagctgc tggatgcctt cgcgttgaa 1520  
ctgcatcag aactcttga tctgcgcgc gcctcggac gactctcgt tcaagtgat 1530  
ggcgatcag ccgtccggg cactratgg cttggaagtc aggcaggtgt acagacctt 1540  
gatatcgaag taacgcgctt caggaagtt gaacaattc tctagaagt tggccagta 1550

gansatggcg cgcgataga cgttggtgggt caggtggctcg atgactttga gacctgcacc 368  
 gacgggattg cgtccacac cttcgaggta caggaagtcg atgtcgtaga tcgagctgac 3710  
 ttggccaaa cgttcgatca ggtacaacgg cgcgcgcgcg atgcctttga tcgcgggcag 3740  
 gttcaatttc atcgcccggt tctcaatatg gatcggttgg gcgcgcagtt ccagggcgcg 3840  
 gctgtatg ttttgcgagt cttcaccgcg gaaagccatg cgcacacacg acgggcgcgtg 3900  
 ttggcgga aagtaggagg cgatgctttt gggctcgttg ttgaggatca ggttgatctc 3960  
 gctcggcggg tacaggtgca cgttcttga aaggtgggtc ggaactttcg tgaagccat 4020  
 gatctcgaag atcggtcca ggtaccgg cgtcgccgac ggaatttga tgaattcaaa 4080  
 gcccatcagg ccattgggt tttcgtacg atctgccatg caccggatcc ttcgcgcgtt 4140  
 gctgacgttg ccaggcttc tggaggagcg ggggcgcagc gggaggcttg cgttggaact 4200  
 gagcccttg aacggagcga cggcggtggc cgacggaggc atcatcagg tgggcgcac 4260  
 tgcacgcgc gccaggtacg acagcgtctc gaactcttg ttgcgtagg ccgggcacac 4320  
 ctgcataat tgaactcttc caccgttgcg ggaagggtg gagaagtgt tagcctctc 4380  
 gccggtggg aaggcggcgt tggacttaag gccgttgaac gcagccaca tgttgccctg 4440  
 aqcagggcg gtcggctaa cgttcgcgac tgaggaggag atcgaagcca tggcgccctg 4500  
 gctgcctagt atgtatgtac tcgtcgttg cttgggaatt cgatggtga gaatccaatg 4560  
 agtgacttta gtgattatga gctgtatata taatacttgt acatgagctg cctgcacac 4620  
 aacygataaa aacaaatcta tcttaacttg tagtgattct gagcgtagga tgttggtggt 4680  
 cttggaatt catgcatagt gtccacataa tataattgca atttgaagac cttatcctat 4740  
 aaccaccga aatggagagc cactgttcaa atgcacattg ctcaaaatat cttatctcat 4800  
 cttctaaagg agaggttagc atggaagggt cggagggtga gtgtaattt tatgaatcat 4860  
 gaggttaata gtgtgtggtt catattgta atgttttaac tatcatgagc gtttgaaaat 4920  
 ctgtacagt aattaagtag cagatgtgtt atttttcctc cactcctgt cacattgct 4980  
 ataattcaaa agagtttcaa aaattaccta aaaaccatgt aaattccttg aaactacacg 5040  
 aaattctaaa aagaaaatat tgatatcaaa atacgtgaaa actggaccaa tattaccoga 5100  
 aactggacca atatgttgta gtgtggttga gcgcctatg ataatgttc tagtctttt 5160  
 aatagtaagg ttggaattat taaagcataa ataaaaaca aatacaata caaatttatt 5220  
 aagactagaa aaattgtatc atcaagtat tgaattatct agaggatccc cgggggatcc 5280  
 a 5381

• 110 • 2

• 111 • 5909

• 112 • ALN

• 113 • Sequence artificielle

• 121 •

• 123 • Description de la séquence artificielle: gène chimère

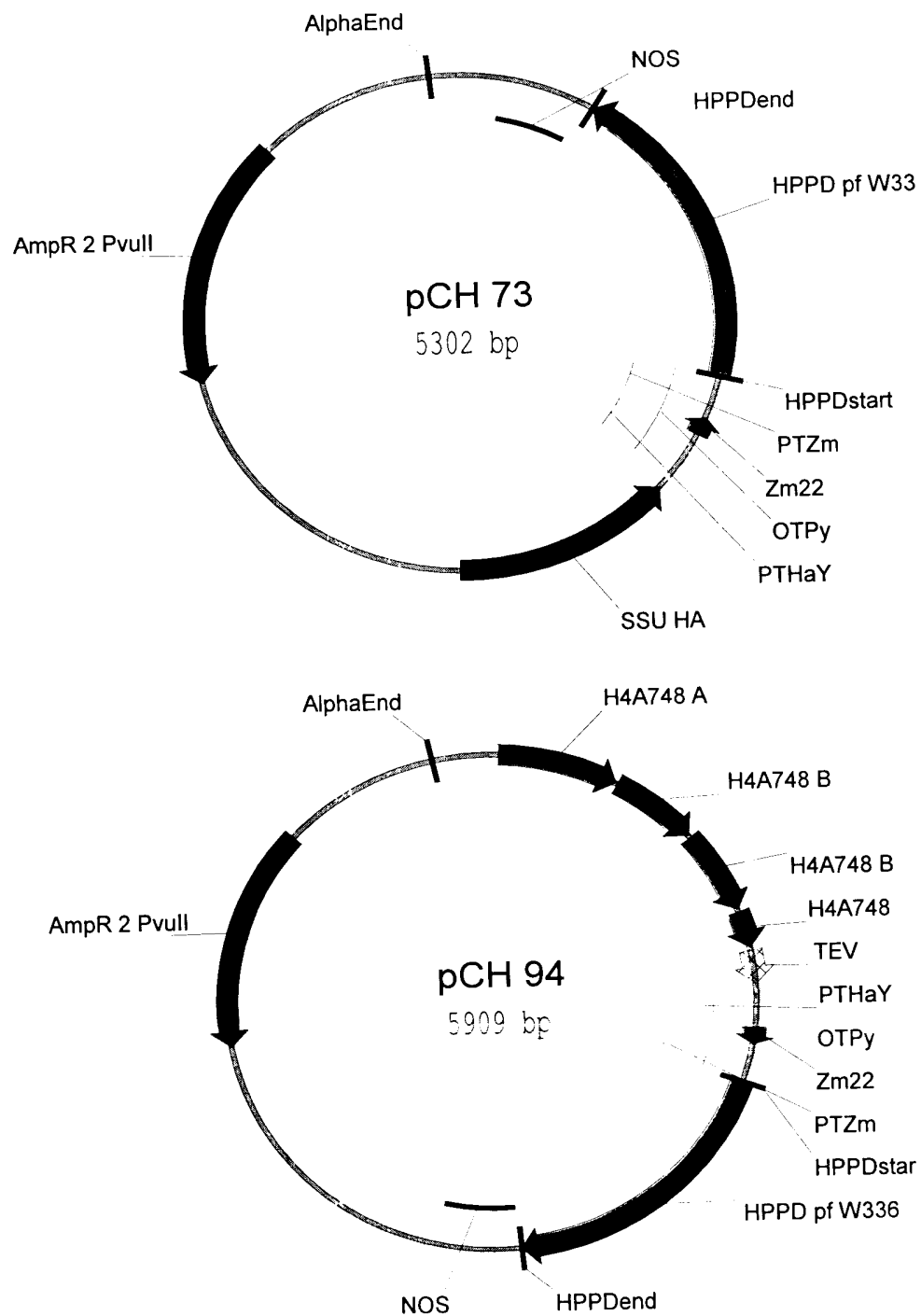
• 400 • 2

ggtggcgccc gctctagagc tgcctgctt gcaggctcag gagaattatg agtcgaggca 41  
 tggatacaact aagttccctt gaagtggaca tgatctttga tggtagatg attccacagag 120

caagatagtt tgtgttgcaa gtgacacaat tgtaatgaaa caacacacaa aggaatttaa 180  
tttgaggcttt gacatgttgt gtgtgtgtgt tgtatttgtg agtgacggtt ggtatttatt 240  
tttggttaag tgattttaaa accttttatg taaatagtta cttttatgat tgaagtgtgt 300  
tctgtgtgtc tatagttttt caaaggqaaa ttaaaatggt gacatccttt ttaacattga 360  
taatttggtt tacacaaact ttgtaaattt ggtgatattt atggtcctaa gaagtaata 420  
ccatttgtat gttacaatat caatatcaat acgataactt gataataaa acatgtgatt 480  
gttattgttt ttccagtato aatatacatt aagctactac aaaatttata taattcacta 540  
tattataaat ctttttcggt tgtaacttgt aattcgtggg ttttttaaat aaaagratgt 600  
gaaaattttc aaataatgtg atgacgcaat ttatttttcc gagtccaaa atattccac 660  
ttcatttacc taatttgttg ggcacatgt aaaacaaaaa aggatttata gtgttatata 720  
ctgcacacac ggggacact aatatgaac gtgcattaaa acagatcgac ggtttataa 780  
tcattttatt gtacacacgg atcgtatgat tgtcactgtt ttccagtat caattacat 840  
taagtataa caaaattagt ataaatcact atattataaa tcttttgg ttgttaattg 900  
taatttggtg gtttttaaaa taaaacatg tgaattttt caaataaagt gatttcgaaa 960  
ttttatttc cagatttcaa aatattcgg cttcattacc ctaatttgg gctccacatg 1020  
taaaaacaaa gacgatttct agtggtatc actgcacaca ggggattac taattgaac 1080  
cgtcgattaa aacagatoga cgttttatac atcattttat tgtacacacg gatcgatata 1140  
tragcgtta gatttaatat gogatcgat tgcacaaaaa atagacatc cgttttggc 1200  
tataaaaaa attcacatc ttctcacc aaatcactc ttaacattc ttctttct 1260  
atagacatca attctctcg actetagaat tggaaacaca acataacaa aacaaaacaa 1320  
tctcaagaaa tcaagcatc taattctatt gacgaattt aaatcattc ttttaagca 1380  
aaagcaattt tctgaaaatt ttacacattt aggaacgata gacatgtgtt cgtctctc 1440  
ctcagtcggg acggttagcc ggacggccc tgcaggcc aacatgttg ctcggttacc 1500  
cgtcttcaag tccaaacggc cttcccccac caccagaag gctaaatct tctcaccct 1560  
tccagcaac gguggaagag ttcaatatat gcaggtgttg cgggcctac gaaacaaaa 1620  
gttcagagac cgtcgttacc tgcgctcgtt gctatgacg cccacgtga tcatggctc 1680  
gtcggcacc ggcgtcgtc cgttcacagg gctcaagtc accgacgac tcccgctgc 1740  
ccgcggtac tccagaagcc tggcgaact cagcaacgga ggaaggatc ggtcgtgt 1800  
agatttatc gaaaaccaa tggcctgat gggtttcaa ttcatcaat tccgtcgc 1860  
aacgctagg acatggagc caatttga cttcctgcg ttcatcaag tccagacaa 1920  
tcgttcaag aacgtgcac tgcacgca gggcgagat aacgtgatc tccagacaa 1980  
gccaacagc atcgctctt aatttggc cgaacacgga cgttgtgt ggggatgac 2040  
gttcgggtg aaggactgc aaaaggtta caacgggac cgggacttc ggcctagcc 2100  
gattcatatt gacacgggc cgttggaatt gaaactgac ggcataaag ccatggcgc 2160  
cgttcgtg tactgatgc accgttcgg cgaaggagc tggatcagc acatgcact 2220  
cgttatctc gaaggtggg agcgcaatc ggttggtga ggtctaaaag tcatgacaa 2280  
ctgacacac aacgttatc gggcgccat ggtctactg gcaattctc atgagaaatt 2340  
gttaacatt cgtgaaggg gttacttga tatcaaggg gattacacg gctgaattc 2400  
caagccatg agtgctggg accgatgat ccgatccg ctgaaggaag atcgttcaa 2460  
gggtcgggg cagatgaag agttcctgat gcagttcaac gggaaggca tttagcact 2520  
ggcgttctc accgacgac tgytcaagac cgggacgac ttgaagaaaa tggctgacg 2580  
ttcatgacg ggcgggacg acatttatta cgaatgctc gaaggggac tgcctgacca 2640

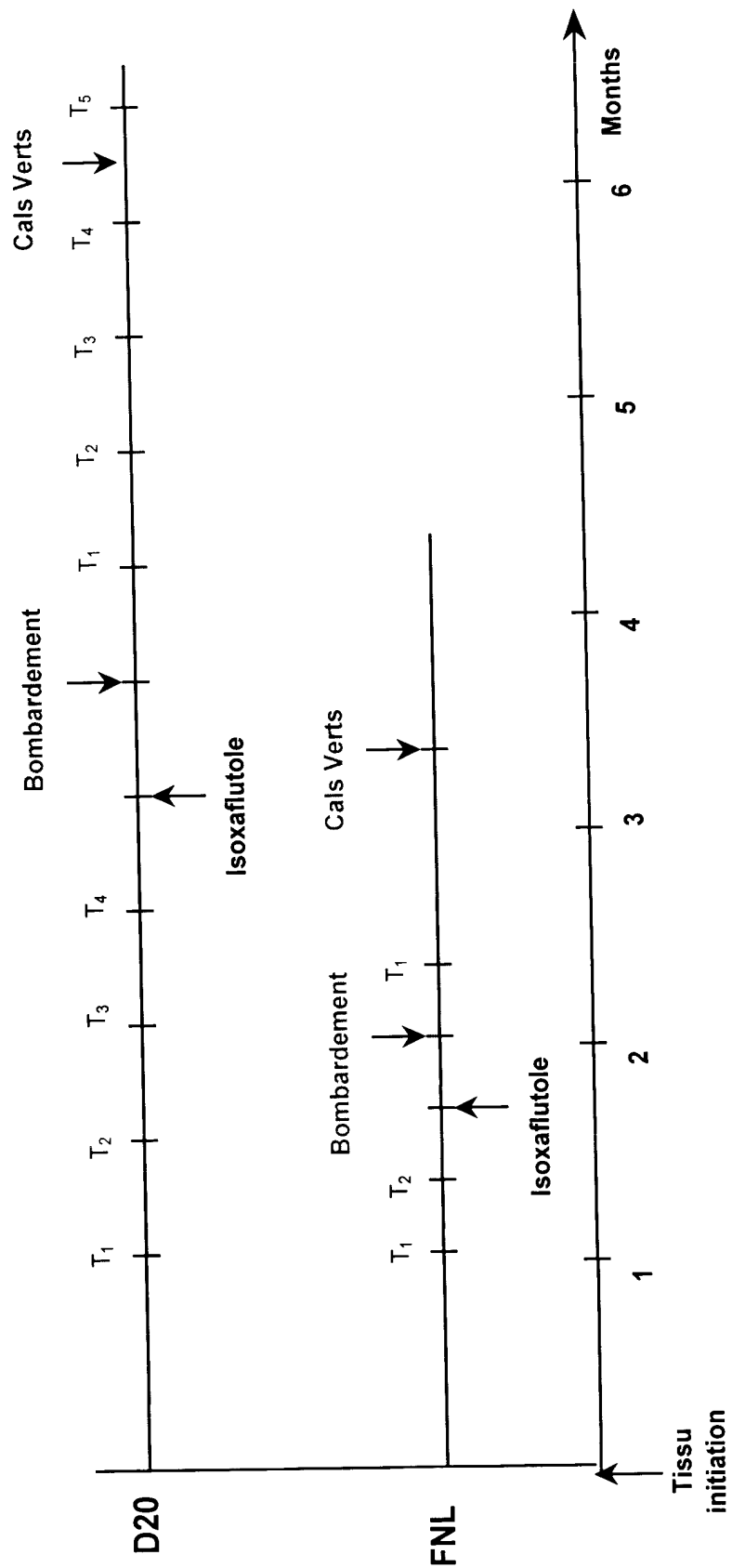
cgggagagcgg gtggatcaac tgcaggcagc cgggtatcctg ctggacggat cttcngtgga 2700  
aggagacaaa cgcctgctgc tgcagatctt ctgggaaacc ctgatgggoc cgggtattctt 2760  
cgaattccac cagcgggaagg ggcagcatgg gtttggcgag tggaaacttca aggcgtgttt 2820  
cgaatccacg gaacgtgacc aggttggctcg tgggtattg acggccgatt aagcgtcaaa 2880  
aagcccgggc gagggtagct cgaagiatct ccccgatcgt tcaaacatct ggcaatcaag 2940  
ttttttaaga ttgaatccctg ttgcggctct tggatgatt atcatataat ttctgtgaa 3000  
ttangttaag catgtaataa ttaacatgta atgcctgacg ttattttatga gatgggttt 3060  
tatgattaga gtcccgcaat tatacattta atagcgata gaaaaaaaaa tatagcggc 3120  
aaactaggat aaattatcgc cgcgggtctc atctatgta ctagatcngg aattgcggc 3180  
gcaatccact ggccgtcgtt ttacacgctc gggactggga aaacccctgc gttacccaac 3240  
ttaatcgct tgcagacacat cccctcttcg ccagccagct gcattaatga atcgcccaac 3300  
ggcgggggag aggcggtttg cgtattggc gctctccgc tctctcgtc actgactcgc 3360  
tgcttccgt cgttcggctg cggcgagcgg taccagctca ctcaaaaggc gtaattangt 3420  
tatoracaga atcaggggat aacccaggaa acaacatgug agcaaaaggc caacaaagg 3480  
ccaggaaacg taaaaaggcc gcttgctgg cttttttcca taggcctcgc cccctgaac 3540  
agcatcaaa aaatcgagc tcaagtcaga ggtggcgaaa ccgacagga ctataaagat 3600  
acnaggcgt tcccccgga agctccctcg tgcctctcc tgttcggacc ctgacgctta 3660  
ccggatacct gtccgcttt ctccttcgg gaagcgtgc gctttctat agctcagct 3720  
gtaggatat cagttcggg tagctcgtc cctccagct ggcctgctg caagaaaccc 3780  
cccttcagcc cgaacgctgc gccttatcc gtaactatc tcttgactcc aacccggtaa 3840  
gacacgact atccgactg gcagctgca cgtgtaacag gattagaga ggcaggtat 3900  
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtgt ggcctaaact cggctacact agaagagag 3960  
tattcggtat ctgcctctg ctgaagccag ttaccttcg aaaaagagtt ggtagctctt 4020  
gacccggcaa acaaacacc gcctggtagc gctgctttt ttttgcaag cccagatta 4080  
cgcccaaaaa aaaaggatct caagaagatc ctttatctt ttctacggcg tctgacgctc 4140  
agtgyaaca aaactcaggt taaggatct tggctcatg attatcaaaa aggtatctca 4200  
ctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaactaat ctaagtata tatgagtaaa 4260  
cttggtctga cagtaacaa tgcctaatca gtgaggcaac tatctcagcg actgctctat 4320  
ttccttcac catagttgc tgaactcccg tctgtgat aactacgata cgggagggct 4380  
ttctatcgg cccagctct gaaatgaa ccccgaccc agctcaccg gctccagat 4440  
tatagcaat aaacagcca gctggaggg ccgagcgag aagtgtctt gaaattat 4500  
cgcctccat ccagtctatt aattgtgcg ggaagctag agtaactagt tgcagttta 4560  
aaagtctgc caaggttgt gcaatgta caggcatcgt ggtgtcagc tctgtgttg 4620  
gtaagcttc attcagctcc gcttcacaa gacaaacgc agttacatga tcccatat 4680  
tggcaaaaa agcgtttagc tcttcggct ccccgatcgt tctcagaaat aggttggc 4740  
cagtgttct actcatggtt agggagac tgcctaatc tcttctgtc atgcctatc 4800  
taagatgctt ttctgtgact ggtgagta ccaacagtc attctgagaa tatgtatgc 4860  
ggcagccag tctctcttgc cggggtcaa nacgggataa taccggca catagcagaa 4920  
ttctaaaagt gctcatcact gaaaaagtt cttcggggc aaaactctca aggtatctac 4980  
cgtgttgag atccagttcg atgtaacaa ctctgacac cagtgatct tcaatctt 5040  
ttactttcac cagcgtttct ggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgc gaaaaaagg 5100  
gaataagggc gacagggaaa tgtgaatac tcaactctt cttttttcaa tattattgaa 5160

gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 5200  
aacaaatagg ggttcgcgcg acatttcccc gaaaagtgcg acctgacgcg cctgttagcg 5210  
gcgcattaag cgcggcgggt gtggtgggta cgcgcagcgt gacgcctaca cttgccagcg 5340  
ccctagegcg cgcctcttcc gcttctctcc ctctctctct cgcctacgtc gcgggcttcc 5400  
cccgtaagcg tctaaatcgg gggctccctt taggggtccg atttagtgcg ttacggcacc 5450  
tcgaccccaa aaaacttgat tagggtagtg gttcacgtag tgggcacatg cctgataga 5520  
cggtttctcg ccttttgaag ttggagtcca cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa 5530  
ctggaacaac actcaacctt atctcggctt attcttttga ttataaggcg attttgccga 5640  
tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca 5700  
aaatattaac gcttaacaatt tccattcgcc attcaggctg cgcactgtt gggaaggcg 5760  
atcggtgccg gcctcttcgc tattaagcca gctgatttaa atttaattaa ggcgcgccca 5820  
tggatcgatg ttaacatgca tgatatcag cgtggcgcca ctagtgctag cagatctggc 5880  
cgcccccacg gtgggccata tgggcgcgc 5909



**FIG. 1**

2/2



**FIG. 2**